云　南　植　物　研　究　1999，21（1）：81～86
Acta Botanica Yunnanica

蓝藻 Oscillatoriaceae rDNA16S－23S 基因间隔区的序列分析及其分类学意义*

陈月琴[1]　唐绍清[1]**　何家莞[2]　庄　丽[1]　屈良鹄[1]
（[1]广州中山大学生命科学学院，广州，510275）
（[2]中国科学院水生生物研究所，武汉，430072）

摘要　采用末端终止法对蓝藻类颤藻科 *Oscillatoria* sp. rDNA 16S－23S 基因间隔区进行了序列测定，获得了 *Oscillatoria* sp. rDNA 基因间隔区 427 个核苷酸，其中包含 1 个异亮氨酸 tRNA 基因（$tRNA^{Ile}$）。并通过计算机联网从国际分子生物学数据弹库中获取颤藻科其它种的 rDNA 基因间隔区序列，通过比较分析，从分子水平对颤藻科 Oscillatoriaceae 属间的某些分类学问题进行了讨论，并根据序列中核苷酸差异值探讨了颤藻科属间界定的分子标准。提出了 rDNA 基因间隔区是良好的分子标记，可用于"赤潮"或"水华"蓝藻专一性核酸分子探针的研制。
关键词　颤藻科，rDNA 间隔区，序列分析，分类学意义
分类号＿Q 943

Sequence Analyses of rDNA Intergenic Spacer Region from Oscillatoriaceae（Cyanobacteria）and Its Taxonomic Significance

CHEN Yue－Qin[1]　TANG Shao－Qing[1]　HE Jia－Wan[2]　Zhuang Li[1]　QU Liang－Hu[1]
（[1]*School of Life Science*, *Zhongshan University*, Guangzhou 510275）
（[2]*Institute of Hydrobiology*, *The Chinese Academy of Sciences*, Wuhan 430072）

Abstract　The sequence of rDNA Intergenic Spacer Region（ISR）was determined for the species *Oscillatoria* sp.（Cyanobacteria）. The spacer sequences was 427bp in lengh exclusive of 16S and 23S rDNA coding regions, containing a Ile tRNA gene. Based on the analyses of the obtained sequences and the sequences from other three representative species of Oscillatoriaceae, and two species of *Microcystis*, the evolutionary affiliation among the genera of Oscillatoriaceae was discussed. In addition, the results showed that rDNA Intergenic Spacer Region can be served as a criteria for the identification or the classification of Cyanobacteria within the genus or intraspecies, which may be a useful genetic marker at the species or population level and may be one of the most suitable regions in the rRNA gene cistron for preparing DNA probes specific to Cyanobacteria species because of the high divergence of this region.
Key words　Oscillatoriaceae, rDNA Intergenic spacer region, Sequence analyses, Taxonomic significance

颤藻科 Oscillatoriaceae 是藻体呈多细胞单列丝状体的丝状蓝藻，为不产生异形胞和孢

* 国家自然科学基金资助项目（39770058 和 39770115）　**现在工作地址：广西师范大学生物系
1998－07－27 收稿，1998－09－15 接受发表

子，以段殖体繁殖的一类。颤藻科包含许多形态非常相似的属种，如颤藻属、红颤藻属、席藻属等，属间形态界定标准很不清楚，以致某些种的归类一直存在争议，如红颤藻属的一些种类（*Trichodesmium* sp. strain NIBB1067），是置于颤藻属还是红颤藻属不同的学者看法不一。为了解决分类鉴定的这些问题，90年代以来，以基因序列为基础的细菌（包括蓝藻）的分子鉴定和分类方法已得到广泛的应用，人们试图从DNA水平获得稳定且可靠的分类指标。目前在蓝藻某些类群的分类学研究中已获得有意义的结论（Rudi *et al*，1997；Neilan *et al*，1997）。从DNA水平对颤藻科属间界定标准的探讨尚未见有报道。

本文以核糖体16s和23s rDNA之间的转录间隔区—ISR区（Intergenic Spacer Region）为分子指标，ISR区为高变的区域，在生物各类群属下水平的研究，可提供较多的信息，用于属间及属下水平研究已证明是一个很好的比较指标（Jesus *et al*，1996）。对从我国湖北大冶三里七湖分离的颤藻属的一种 *Oscillatoria* sp. ISR区进行序列的测定，并通过Internet进入国际分子生物学数据库获取颤藻科其它种的rDNA基因间隔区序列，从rDNA16S-23S基因间隔区序列对颤藻科Oscillatoriaceae属间的某些分类学问题进行讨论，进而探讨其属间界定的分子标准。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究测序用的材料为 *Oscillatoria* sp，由中科院水生所藻类室采自中国湖北大冶三里七湖，镜检结果初步鉴定为拉氏颤藻（*Oscillatoria raciborskii*）。颤藻科其它3种 *Trichodesmium* sp.，*Spirulina* sp 和 *Arthrospira* sp 16S-23S rDNA基因间隔区序列从Genbank中获得。用作外类群比较的另外2种蓝藻 *Microcystis aeruginosa* 和 *Microcystis wesenbergi* 的间隔区序列由本实验室测定。详见表1。

表1 本研究所用材料种名、株系及其来源

Table 1 Names, strains and origin of species used in the study

种名	株系	采集地	序列来源
Oscillatoria sp	未定	湖北大冶三里七湖	本研究测定
Trichodesmium sp	NIBB 1067	Kuroshio waters, Japan	Genbank（accession number: X72871）
Spirulina sp	PCC6313	Unknown	Genbank（accession number: X75044）
Arthrospira sp	PCC7345	Unknown	Genbank（accession number: X75045）
Microcystis aeruginosa	M8641	中国武汉东湖	本实验室测定
Microcystis wesenbergi	M574	中国武汉水生所关桥实验站鱼池	本实验室测定

1.2 Oscillatoria sp DNA的制备及rDNA基因间隔区（ISR）的PCR扩增反应

DNA的制备：取50~100 μL培养液于0.5 mL的离心管中，8 000 r/min离心2 min，弃上清，加入25 μL提取缓冲液（1% SDS，10 mmol/L EDTA，pH 8.0；10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，10 mmol/L NaCl）；采用本实验室研制的DPS纯化系统直接从提取缓冲液中获取微量DNA用于PCR扩增，PCR扩增反应条件等见文（陈月琴等，1997）。PCR引物为：M16：5'GGGGATGCCTAAGGCAGGGCT 3'，M23：5'CCACGTCCTTCTTCGCCTCTG 3'，分别对应于16S rDNA 3'末端和23S rDNA 5'末端区域，于中国科学院上海生物化学研究所合成；扩增完成后，PCR产物用乙醇沉淀或DPS系统纯化，沉淀晾干后加适量TE溶解，取

2 μL 于 1%的琼脂糖凝胶上电泳检查，其余－20℃保存备用。

1.3　rDNA ISR PCR 扩增产物的克隆及序列测定与分析

PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化后，与质粒载体连接，质粒载体为 pTZ19，按《分子克隆》（萨姆布鲁克等，1996）一书操作。采用美国 Life Science Sequenase Version 2.0（USB）测序试剂盒直接测定重组质粒的 DNA 序列。采用计算机分析软件包 Phylip35 和 PC gene 6.0 进行序列的比较分析。

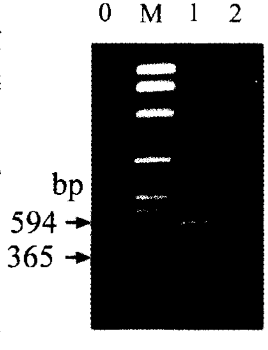


图 1　rDNA 16S－23S 基因间隔区 PCR 扩增结果

Fig. 1　The results of PCR amplification 0. Control（无模板 DNA）；M. 2kb 分子量标准 1. *Oscillatoria* sp；2. *Microcystis* sp.

2　结果与分析

2.1　Oscillatoria sp. rDNA 16S－23S 基因间隔区（ISR）PCR 扩增和序列测定结果

为了避免常见细菌对 PCR 造成的污染，我们合成了专一性的 PCR 扩增引物 M16 和 M23，分别为 16S rDNA 3'末端和 23S rDNA 5'末端保守序列，可用来专一性地扩增微囊藻属，颤藻属及其它蓝藻 rDNA 16S－23S 基因间隔区。PCR 扩增结果见图 1（图中 *Microcystis* sp. 为对照材料）：PCR 产物长度约 540 bp（包括 16S 3'末端和 23S 5'末端 rDNA 部分序列）。PCR 产物以 DPS 系统纯化，并连接到 pTZ19 的 SmaI 位点上，通过 PCR 和限制性内切酶等方法检查转化子，采用末端终止法测定重组质粒的 DNA 序列。*Oscillatoria* sp. 16S－23S 基因间隔区的长度（不包括 16S 3'末端和 23S 5'末端 rDNA 部分序列）为 427bp，包含 1 个异亮氨酸 tRNA 基因。其中，16S rDNA 与 tRNA 基因的间隔区（简称 ISR1）长度为 137bp；而 tRNA 基因与 23S rDNA 间隔区（简称 ISR2）为 210bp，整个基因的间隔区 G＋C 含量为 48%。测定不同克隆子，得到相同的结果，序列见图 2。

2.2　颤藻科（Oscillatoriaceae）属间 rDNA 基因间隔区的序列比较和分析

目前，国际上对蓝藻 rDNA 的研究主要集中在 16S rRNA 及 rDNA 的序列比较分析，对 rDNA 基因间隔区的报道还很少。通过计算机联网从国际分子生物学数据库（Genbank）中获取颤藻科（Oscillatoriaceae）其它 3 种：红颤藻属的 *Trichodesmium* sp. 螺旋藻属的 *Spirulina* sp. 和 *Arthrospira* sp. 16S－23S rDNA 基因间隔区序列，并与我们所获得的 *Oscillatoria* sp. 的序列进行比较，我们发现，颤藻科不同属种，其 rDNA 间隔区在长度、tRNA 种类和数目以及核苷酸有较大的差异（序列比较见图 2），颤藻科已知种类 rDNA 基因间隔区有 2 种类型，一种为 *Oscillatoria* sp. 和 *Spirulina* sp 所具有，其基因排列顺序为：16S rRNA—$tRNA^{Ile}$—23S rRNA，*Trichodesmium* 和 *Arthrospira* sp 为另外一种：即 16S rRNA—$tRNA^{Ile}$—$tRNA^{Ala}$—23S rRNA。从序列比较来看，4 个种都包含 $tRNA^{Ile}$基因，而且，tRNA 基因在各个种内同源性较高，仅个别位点发生碱基缺失或插入事件。同样，*Trichodesmium* 和 *Arthrospira* sp 所含的 $tRNA^{Ala}$基因也具有较大的保守性。但是，16S rDNA 与 tRNA 基因的间隔区（ISR1）与 tRNA 基因与 23S rDNA 间隔区（ISR2）在长度及核苷酸上则有明显的差异。各个种之间比较结果见图 2 和表 2。表中 *Microcystis aeruginosa* 和 *Microcystis wesenbergi* 作为参考序列。

```
              16S rRNA
O.sp   GCTGGATCACCTCCTTTCAGGGAGACCTTACCCACCTCAACTCGAAAGCACAATGCAAAT
S.sp   GCTGGATCACCTCCTTTAAGGGAGAGACCTCAAAGGGATGAAACCAAAGCGAAANAGAGG
T.sp   GCTGGATCACCTCCTTTA-AGG-GAGACCAACCGGATCAATACAGTAAGATTAAAAATAG
A.sp   GCTGGATCACCTCCTTTTTAGG-GAGACCTACTTCGAGATATCGCGCCTTAACAACTATA

O.sp   AGAGAGAGGATTGGTCAACCTAGGTACAGGTCGAGGAATT--------------------
S.sp   AATCTAAAAAACTAACTTCACTCAATGACATCCCAAGGTCGTTCGGAGAACCTGATTATC
T.sp   TGTTGTGAAGGTCAAACCCTGGTCGAGCAAGGATAAATAAAAAAAGTAGTA---------
A.sp   GCCGTGTCTTGAGGTCATCCTTAGGTCGGATGGGGCGGT---------------------

O.sp   TGTGTGGCTCTCAAACTTGTCTGGGTTTACTTCTAAAAAGAAGGGAA-------------
S.sp   AATAAAGCTCTCAAACTATGGGGTTCGG--------------------------------
T.sp   AAGTAAACTTTCAAACTAGAGTTAAGGTTGATAAATGGGCTATTAGCTCAGAAGGTTCGA
A.sp   CAGAGAGCTTTCAAACTTTAGGGTTCGT--------------------------------
                                                Ile tRNA
O.sp   AACGAGGGCTATTAGCTCAGGCAGGTTAGAGACGCACCCCTGATAAAAGGTGAAGGTCCT
S.sp   AAAATGGGCTATTAGCTCAGG-TGGTTAGAG-CGCACCCCTGATAA--GGGTGAGGTCCC
T.sp   TAAATGGGCTATTAGCTCAGG-TGGTTAGAG-CGCRCCCCTGATAA--GGGTGAGGTCCC
A.sp   GTTATGGGCTATTAGCTCAGG-TGGTTAGAG-CGCACCCCTGATAA--GGGTGAGGTCCC

O.sp   AGTTACGAGTCCAGGATGGCCCACCTT---------------------------------
S.sp   TGGTTCAAGTCCAGGATGGCCCACATTTAAC-------------Ala tRNA--------
T.sp   TGGTTCAAGTCCAGGATAGCCCACCTAAGAAGGGTAAGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGA
A.sp   TGGTTCAAGTCCAGGATGGCCCACATCACCCCAAACTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGA

O.sp   ------------------------------------CAAAAACGCTCAAGAGAGAGATACC
S.sp   CGAGTCAGAACCAGAAAGACAGTAGCACCTATGAGGTAACAGCAAACTAGTGTCAAGACA
T.sp   GCGCTGCCTTTGCAAGGCAGAAGTCAGCGGTTCGAKTCCGCTTACCWCCAGGAATAAAAA
A.sp   GCGCTGCCTTTGCACGGCAGAAGTCAGCGGTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTTTG

O.sp   TCTTAAGGGGTAGCTTCATCTCTAAAACAGATTTATGCATCAGGAAATCGAAGTTTGCCT
S.sp   TAAGTTTTCACTGTGAAGCTGCATGATATCTCTAAGAGTGAATCAGAACGCTGTCGAAGA
T.sp   AGGTAGAAATCAGCA-ACAAGACCTGAATAAAGCAAAGCAAGTCATGCTGCTGGTATTCT
A.sp   TGATGGTGCTAGTTGGGGTGAGATGAGATGAGGTTACCTCTGATAGATAGATAATTTATC

O.sp   TCAAGAGAGAACATGAGTTCAGCACTTCTAACCATTTCCAGAAGCCTGCTGAACTAATGT
S.sp   AAAAAGTAAGGATAAGATTCAGCACTGCTCGAAAGAAGAGTAAATGCTGGATTTCAAGTC
T.sp   TAAATA------------------------------------------------------
A.sp   ACTGTACAGCTCCTAAATCTTTAGATATTACTCTGAGATTGGATAGCTGGACATCTGTT-

S.sp   TCAGCCAGAACCTTGAAAACTGCATAG-CAACAAAAGCCAAAGCAAGGTAGTCGAGAGTC
S.sp   CAGCCCAGAACCTTGAAAACTGCATAGTCAAGAATCAAAAGTGTAGAGAGTCCTGTTTAG
T.sp   CCAGTAAGAACCTTGAAAACTGCATAGTCAAAAAAAAGTCAAAGTAACTGAACCAGAGGTT
A.sp   CCAGTCAGAACCTTGAAAACTGCATAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAA

O.sp   AAC------------------------------------------AGCGATCAAGCTACAA
S.sp   CAGGAATCTTAAAACAAG--------------------------TTAGGTCAAGTTACAA
T.sp   AAGTAAAACCTTAAAAAAATCTAGTTCAGGTGTAGAAAGAAAAAAGTGGTCAAGTTATAA
A.sp   AGACAATTCCAAT-------------------------------GTAGGTCAAGCTACAA

O.sp   AGGGCTCACGGTA
S.sp   AGAGCTAACGTT-
T.sp   AGGGCTGACGGT-
A.sp   AAGGGCTAACGGT
     23S rRNA
```

图 2 Oscillatoriaceae 属间 rDNA 基因间隔区的序列比较

Fig2. Sequence alignment for the nucleotides of rDNA intergenic spacer regions between the species of Oscillatoriaceae

O. sp: *Oscillatoria* sp, S. sp: *Spirulina* sp, T. sp: *Trichodesmium* sp, A. sp: *Arthrospira* sp, －代表缺失的核苷酸。

表2　颤藻科不同种 rDNA 基因间隔区特征

Table 2　Characteristics of rDNA ISR among the species of Oscillatoriaceae

种　名	株　系	间隔区总长度 (bp)	G＋C (%)	tRNA 类型
Oscillatoria sp	未定	427	48	$tRNA^{Ile}$
Trichodesmium sp	NIBB 1067	501	41	$tRNA^{Ile}$　$tRNA^{Ala}$
Spirulina sp	PCC 6313	476	51	$tRNA^{Ile}$
Arthrospira sp	PCC 7345	481	53	$tRNA^{Ile}$　$tRNA^{Ala}$
Microcystis aeruginosa	M 8641	360	47	$tRNA^{Ile}$
Microcystis wesenbergi	M 574	364	47	$tRNA^{Ile}$

3　讨论

3.1　*Oscillatoria* 与 *Trichodesmium* 的分类学问题

从形态结构来看，*Oscillatoria* 和 *Trichodesmium* 为形态非常相似的2个属，其属间的区分常常根据细胞内空泡的大小或排列方式（Anagnostidis *et al*，1988）。一般认为，*Trichodesmium* 细胞内有空泡存在，而 *Oscillatoria* 无。但是显微研究结果表明，*Oscillatoria* 许多种细胞内同样存在类似空泡的结构，即所谓的假空泡结构，因此有的学者根据其形态的一致性，将 *Trichodesmium* 与 *Oscillatoria* 合并，统称为颤藻属 *Oscillatoria*（Sournia，1968）。但是，从这2个属代表种 16S－23S rDNA 间隔区序列比较结果来看，二者序列差异较大，核苷酸相似性值仅为65%。而 *Oscillatoria* 与 *Spirulina* 或 *Arthrospira* 核苷酸相似性值也是65%～68%。根据我们对微囊藻属的研究，同属不同种基因间隔区序列具有较大保守性，序列间核苷酸相似值为94%～95%（陈月琴等，1999）。从这一点看，*Oscillatoria* 和 *Trichodesmium* 作为独立的属较为合适。这一结论与16s rRNA 基因比较结果是一致的（Wilmotte *et al*，1994）。尽管蓝藻与其它真细菌一样，不同种类其 rRNA 操纵子会有差异（Nichols *et al*，1982），但在蓝藻中，同一种类 rRNA 操纵子具有较大的保守性（Tomioka *et al*，1984），我们测定不同克隆子，得到相同的结果也说明了这一点。

3.2　颤藻科属间界定标准及 rDNA 基因间隔区在蓝藻分类鉴定中应用的意义

从上面分析可以得出，16S 与 23S rRNA 基因之间的间隔序列（Intergenic Spacer Region）是一个特殊的区域，其序列具有较高的突变速率，属间差异较大，而属内种间则有较大的保守性，因此，我们可以根据 rDNA 基因间隔区序列间核苷酸相似值或差异值大小，作为属间界定的判别标准，用于形态相似的属种的分类和鉴定。另外，根据序列的差异，我们可以设计出种的专一性 rDNA 探针，这些探针不仅具有理论意义，而且具有重要的应用价值，尤其是对某些诱发有害有毒“赤潮”或“水华”的产毒种类，如颤藻属的拉氏颤藻（*Oscillatoria agardhii*），微囊藻属的铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* 等，可通过研制出其专一性 rDNA 探针，用于其快速准确的鉴定。为我国海区或湖泊“赤潮”或“水华”的预报预测提供一种新的方法和思路。可以看出，rDNA 基因间隔区的研究从一个新的角度为系统进化研究及属种界定标准提供分子生物学依据。这项研究的进一步深入和扩展，将会对蓝藻分子鉴定及系统学研究发挥重要作用。

参考文献

陈月琴，屈良鹄，邱小忠等，1997．甲藻单个细胞 DNA 的制备及在赤潮藻类分子鉴定中的应用．中山大学学报（自然科学版），**36**（4）：66～69

陈月琴，何家莞，庄丽等，1999．两种淡水微囊藻 rDNA 基因间隔区的分析．水生生物学报，**23**（1）：待发表。

萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T，1996．分子克隆实验指南（第二版），北京：科学出版社

Anagnostidis K，Komarek J，1988．Modem approach to the classification system of cyanophytes．3 – Oscillatoriales．*An Hydrobiol* Suppl，**80**：1～4．

Jesus G M，Antonio M M，Isabel A *et al*，1996．Comparison of the Small 16S to 23S Intergenic Spacer Region（ISR）of the rRNA Operons of Some Escherichia coli Strains of the COR Collection and E．coli K – 12．J．*Bacteriology*，**178**（21）：6374～6377

Neilan B A，Jacobs D，Del Dot T *et al*，1997．rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis．*Int J Syst Bacteriol*，**47**（3）：693～697

Nichols J M，Foulds I J，Crouch D H *et al*，1982．The diversity of cyanobacterial genomes with respect to ribosomal RNA cistrons．*J Gen Micro*，**128**：2739～2746

Rudi K，Skulberg O M，Larsen F *et al*，1997．Strain characterzation and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6，V7，V8．*Appl Environ．Microbiol*，**63**：2593～2599

Sournia A，1968．La cyanophycee Oscillatoria（= Trichodesmium）dans le plancton marin：taxonomie et observations dans le canal de Mozambique．*Nora Hedwigia*，**15**：1～12

Tomioka N，Sugiura M T，1984．Nucleotide sequence of the 16S – 23S spacer region in the rrnA operon from a blue – green alga，Anacystis nidulans．*Mol & Gen Genet*，**193**：427～430

Wilmotte A，Neefs J M & De Wachter R，1994．Evolutionary affiliation of the marine nitrogen – fixing cyanobacterium Trichodesmium sp．strain NIBB 1067，derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis．*Microbiology*，**140**：2159～2164

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※

书讯 Book News